



**PROGRAM STUDI KIMIA
UNIVERSITAS MA CHUNG**

Villa Puncak Tidar N-01, Malang 65151, Jawa Timur

**Modul
Praktikum Analitik Instrumentasi 1
KI 2326**

NAMA :	
NIM :	
Jadwal Praktikum: <ul style="list-style-type: none">• Ruang Laboratorium MRCPP.• Setiap hari Selasa.• Harus datang 5 menit di laboratorium sebelum jam mulai – kalau tidak maka tidak diperkenankan masuk.• Jam istirahat bergantian dalam tim agar eksperimen berhasil.	
Pagi 10:00 – 11:40	Siang 13:00 – 14:40
<ul style="list-style-type: none">• Absensi, Briefing, Tes• Sesi Eksperimen	<ul style="list-style-type: none">• Sesi Eksperimen• Sesi Penutup

Tim Penyusun Modul dan Pengampu Mata Kuliah:

1. Tatas H.P. Brotosudarmo, S.Si., Dipl.Chem., Ph.D.
2. Heriyanto, S.Si., M.Si., M.Sc.
3. Monika Nur Utami Prihastyanti, M.Si., M.Nat.Sc.

Halaman Pengesahan

No. Dokumen : 001
Revisi : -
Mata Kuliah Praktikum : Praktikum Analitik Instrumentasi 1
Kode Mata Kuliah Praktikum : KI 2326
SKS : 1,33
Program Studi : Kimia
Semester : 3 (tiga)

"Praktikum Analitik Instrumentasi 1"

Penyusun:

Tatas H.P. Brotosudarmo, S.Si., Dipl.Chem., Ph.D.
Heriyanto, S.Si., M.Si., M.Sc.
Marcelinus A.S. Adhiwibawa, SP.

Malang, 01 September 2015

Menyetujui,

Kepala Program Studi Kimia,



Dr. Yuyun Yuniati, S.T., M.T.

20140008

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi,



Rudy Setiawan, S.Si., M.T.

20080042

DAFTAR ISI

	Halaman
Pengantar	ii
Pengantar Keamanan dan Keselamatan Laboratorium	1
Alat dan Bahan	5
Eksperimen 1: Ekstraksi dan Separasi Pigmen dari Matriksnya	7
Eksperimen 2: Pengukuran Kadar Air dengan Moisture Balance	10
Eksperimen 3: Pengenalan Sumber Cahaya, Radiasi Benda Hitam	12
Eksperimen 4: Pengenalan Aturan dalam Spektroskopi	15
Eksperimen 5: Spektroskopi Absorpsi untuk Menguji Karakteristik Karotenoid dan Menentukan Konsentrasinya dalam Sampel	17
Eksperimen 6: Mengkonstruksi Spektrometer/photometer dari Awal hingga Akuisisi Data	22
Eksperimen 7: Kromatografi Cair Kinerja Tinggi 1: Sistem Kerja	27
Eksperimen 8: Spektrometri Massa	32
Daftar Link MSDS yang Harus Anda Miliki	34

PENGANTAR

Matakuliah Analitik Instrumentasi adalah matakuliah semester ke-3 Program Studi Kimia di Universitas Ma Chung, dimana mahasiswa diperkenalkan lebih dalam bagaimana suatu bahan kimia dapat dianalisa. Matakuliah ini bersifat *hands-on* atau banyak aspek aplikatif, sehingga mahasiswa yang mengikuti matakuliah ini wajib telah lulus dengan baik Kimia Dasar, Kimia Analitik Kuantitatif, dan Pengantar Komputasi.

Kompetensi yang dibangun adalah kompetensi dalam penguasaan dasar-dasar indentifikasi, separasi, dan karakterisasi senyawa kimia serta prinsip dasar instrumentasi yang digunakan; pengetahuan operasional tentang fungsi, cara kerja operasi instrument kimia, analisis data dan informasi yang dihasilkan oleh instrumen tersebut; kompetensi dalam menerapkan pemikiran logis, kritis dan sistematis dalam mengaji menggunakan piranti/instrumen analisis untuk melakukan analisis terhadap berbagai solusi dalam konteks penyelesaian masalah untuk identifikasi, analisis dan karakterisasi senyawa kimia. Tentunya dengan bekerja dalam tim, maka mahasiswa akan dikembangkan karakter dalam kemampuan membina jaringan kerja yang efektif dan efisien dengan rekan kerja dalam menyelesaikan tugasnya.

Secara khusus modul praktikum kimia analitik instrumentasi ini dirancang secara sekomprehensif mungkin untuk membangun kompetensi-kompetensi mahasiswa dalam penggunaan piranti modern. Selain komprehensif, modul dirancang secara multidisipliner karena mahasiswa akan diekspos untuk bagaimana dapat merangkai rangkaian listrik untuk deteksi, mengolah data dengan perangkat lunak dan menulis program untuk analisa dan statistika. Oleh sebab itu tim penyusun modul merancang agar modul praktikum kimia analitik instrumentasi ini fokus pada analisis pigmen fotosintesis baik dari golongan klorofil maupun karotenoid pada sampel bahan alam. Sedangkan keunikan lain dalam modul ini adalah menggunakan arduino dan rangkaiannya sehingga mahasiswa dapat mengembangkan alat deteksi senyawa kimia sendiri berdasarkan kreatifitasnya.

Pengantar Keamanan dan Keselamatan Laboratorium

Pengantar

Dalam melakukan praktikum kimia instrumentasi mahasiswa akan bekerja dengan beberapa alat dan bahan yang memiliki resiko terhadap keamanan dan keselamatan diri oleh sebab itu sebelum memulai praktikum wajib diberikan pengantar mengenai kesehatan dan keselamatan kerja. Melalui pengantar keamanan dan keselamatan laboratorium ini diharapkan laboratorium menjadi tempat yang aman untuk bekerja, sistem yang aman untuk melakukan penelitian dan pengajaran, dan menyediakan bahan-bahan dan peralatan yang aman untuk digunakan. Seluruh isi dari pengantar ini merupakan satu kesatuan yang mengikat seluruh praktikan sehingga wajib untuk dilaksanakan. Setiap pelanggaran dapat berakibat kepada keamanan dan keselamatan diri praktikan sendiri.

Poin-Poin Keamanan dan Keselamatan Laboratorium

Definisi :

- a. Universitas = Universitas Ma Chung
- b. MRCPP = Ma Chung Research Center for Photosynthetic Pigments
- c. Laboratorium MRCPP = Laboratorium Preparasi, Analisis dan Mikrobiologi (gedung R&D lantai 3)
- d. Staf MRCPP = staf Peneliti dan Asisten Peneliti di Ma Chung Research Center for Photosynthetic Pigments
- e. Pihak Internal = dosen, peneliti, atau mahasiswa Universitas Ma Chung
- f. Pihak Eksternal = dosen, peneliti, atau mahasiswa di luar Universitas Ma Chung
- g. Kondisi darurat = kejadian yang tidak normal, terjadi tiba-tiba, mengganggu kegiatan dan perlu segera ditanggulangi
- h. Kebakaran = suatu reaksi oksidasi eksotermis yang berlangsung cepat dari suatu bahan yang disertai dengan timbulnya nyala api
- i. APAR = alat pemadam api ringan
- j. P3K = pertolongan pertama pada kecelakaan
- k. UGD = unit gawat darurat
- l. *Emergency exit* = pintu keluar darurat yang dapat diakses ketika terjadi kondisi darurat
- m. *Emergency route* = rute yang dapat diakses ketika terjadi kondisi darurat
- n. Gempa bumi = terjadinya pergeseran lempengan tanah di bawah permukaan bumi yang mengakibatkan guncangan
- o. Furnace = tungku pemanas
- p. Fume hood = sungkup asap atau lemari asap
- q. Disinfection = teknik pembasmian mikroba dengan bahan kimia untuk mencegah terjadinya infeksi atau pencemaran
- r. Sterilisasi = teknik pembasmian mikroba menggunakan panas suhu tinggi
- s. Aseptis = teknik bekerja dengan menjaga kesterilan ketika menangani mikroba untuk mencegah kontaminasi
- t. Mutagen = bahan kimia yang dapat menyebabkan terjadinya perubahan materi genetik

A. Prinsip Keselamatan Secara Umum

1. Pengguna laboratorium diharapkan bekerja dengan rapi, menempatkan barang sebagaimana mestinya dan menjaga kebersihan ruangan
2. Pengguna laboratorium wajib mengenakan pakaian dan alas kaki tertutup yang sesuai dan nyaman untuk bekerja di dalam laboratorium.
3. Pengguna laboratorium diharapkan untuk tidak bekerja secara terburu-buru.
4. Pengguna laboratorium dapat melakukan relaksasi badan terutama selama bekerja dalam laboratorium secara terus-menerus.
5. Pengguna laboratorium diharapkan mengerti cara penggunaan fasilitas penanggulangan kondisi darurat, seperti APAR. Instruksi penggunaan fasilitas tersebut dapat dibaca pada manual alat.

B. Pencegahan Dan Pemadaman Kebakaran

1. Ruangan laboratorium harus dilengkapi dengan alarm penanda kebakaran.
2. Hindari penggunaan api di tempat-tempat yang mudah terbakar.
3. Perhatikan batas aman penggunaan bahan berbahaya
4. Jika bekerja dengan melibatkan api, bekerjalah pada meja/bangku yang tidak mudah terbakar.
5. Jangan meletakkan benda yang mudah terbakar dekat dengan sumber panas.
6. Pastikan pintu keluar ruangan tidak terkunci dan tidak terhalang benda apapun.
7. Sebelum pulang, pastikan lampu sudah dimatikan dan tidak ada api yang menyala.
8. Larangan merokok berlaku di setiap tempat di Universitas Ma Chung, termasuk MRCPP.
9. Jika terjadi kebakaran, beri peringatan kepada orang-orang di sekitar.
10. Usahakan untuk memadamkan api dengan APAR sebelum api bertambah besar.
11. Jika api bertambah besar hingga mencapai atap, segera mengungsikan diri ke luar gedung menggunakan tangga darurat. Jangan gunakan elevator.
12. Sebisa mungkin pastikan peralatan elektronik sudah dimatikan.
13. Informasikan kepada Direktorat Pemeliharaan dan Pelayanan Kampus dan Dinas Pemadam Kebakaran.

C. Pertolongan Pertama Pada Kecelakaan

1. Gunakan perlengkapan P3K untuk mengatasi luka ringan. Untuk luka serius, segera bawa korban ke UGD rumah sakit terdekat atau hubungi layanan ambulans.
2. Jika terjadi kesulitan bernapas pada korban, berikan pertolongan pernapasan buatan dengan metode mulut-ke-mulut atau metode Holger-Nielsen.

3. Untuk penyelamatan pada korban terkena bahan kimia pada mata segera bilas mata yang terkena bahan kimia dengan air mengalir sebanyak-banyaknya kemudian segera bawa ke UGD.
4. Untuk penyelamatan pada korban terkena bahan kimia pada badan segera bilas anggota tubuh yang terkena bahan kimia dengan air mengalir sebanyak-banyaknya kemudian segera bawa ke UGD.

D. Antisipasi Gempa Bumi

1. Pastikan tidak ada sumber api yang menyala. Jika ada api yang menyala, segera padamkan.
2. Berhati-hatilah dengan peralatan yang terbuat dari kaca.
3. Selamatkan diri dengan bersembunyi di bawah meja.
4. Jangan berada terlalu dekat dengan tembok atau gerbang.
5. Buka pintu ruangan dan pastikan pintu tidak terkunci dan tidak ada yang menghalangi.
6. Gunakan tangga darurat untuk evakuasi ke luar gedung menuju tanah lapang.
7. Jangan keluar dengan terburu-buru.
8. Pastikan keberadaan dan keselamatan rekan kerja dengan saling menghubungi satu sama lain.

E. Tindakan Pencegahan Berkaitan Dengan Penggunaan Listrik

1. Pastikan untuk menggunakan kabel yang tepat sesuai arus listrik yang ada
2. Berhati-hatilah saat menyekat kabel
3. Berhati-hatilah terhadap resiko tersengat listrik
4. Berhati-hatilah jika terjadi hubungan pendek arus listrik.
5. Hindari terbentuknya genangan air di dekat peralatan listrik.
6. Jangan menggunakan peralatan elektronik jika tangan dalam keadaan basah.
7. Gunakan bahan glass-fiber atau porselen untuk menyekat kabel yang berada dekat dengan *furnace*.
8. Selalu perhatikan polaritas dari komponen elektronik agar tidak menyebabkan arus pendek yang berpotensi menyebabkan kebakaran.
9. Gunakan alas kaki untuk menghindari listrik statis.

F. Tindakan Pencegahan Berkaitan Dengan Penggunaan Gas

1. Pastikan tidak ada kebocoran pada tabung gas.
2. Pasang detektor/alarm untuk menandai adanya kebocoran gas.
3. Pastikan ventilasi udara berjalan dengan baik.
4. Jangan menyalakan api di dekat gas.
5. Gunakan masker pelindung wajah ketika bekerja dengan gas berbahaya.
6. Jika terjadi kebocoran gas, segera buka jendela lalu matikan gas.
7. Pastikan tabung gas selalu berada dalam tempat yang disediakan dan dalam kondisi terantai ke dinding bangunan.

G. Penggunaan Bahan Kimia Dengan Aman

1. Jangan menyentuh bahan kimia secara langsung
2. Gunakan fume hoods jika bekerja dengan bahan kimia berbahaya
3. Pastikan setiap kontainer penampung bahan kimia dilabel dengan keterangan bahaya.
4. Bahan yang dipindahkan ke botol kaca juga harus diberi label dengan mencantumkan nama bahan kimia, konsentrasi (jika ada), tanggal preparasi, dan personel yang menyiapkan.
5. Berhati-hatilah jika mencampur bahan kimia.
6. Benda-benda yang berbahaya disimpan dan dikunci di lemari penyimpanan yang terbuat dari logam.
7. Kembalikan bahan-bahan kimia yang telah digunakan ke tempat semula.
8. Jika terjadi kecelakaan segera lihat petunjuk pada poin C.

H. Pembuangan Limbah

1. Limbah cair harus disaring dari endapan-endapan yang masih tersisa.
2. Tempatkan limbah cair pada kontainer.
3. Letakkan kontainer pada tempat yang sesuai.

I. Prinsip Keselamatan Ketika Melakukan Eksperimen Biologis

1. Jangan makan, minum, menyiapkan atau menyimpan makanan dalam laboratorium.
2. Kenakan jas laboratorium berwarna putih selama berada di dalam laboratorium biologi. Lepaskan jas laboratorium ketika keluar dari laboratorium.
3. Selalu pasang label untuk setiap kontainer penampung bahan kimia.
4. Pengguna laboratorium biologi harus menguasai teknik *disinfection*, sterilisasi dan aseptis.
5. Bahan yang digunakan dalam eksperimen biologis harus disterilisasi sebelum dibuang.
6. Jika berhubungan dengan hewan uji coba, gunakan sarung tangan kulit yang tebal.
7. Pastikan ruang pengembangbiakan selalu dalam keadaan bersih.
8. Penanganan pembuangan organ tubuh atau karkas dari hewan uji coba serta jarum suntik atau pisau yang digunakan dalam eksperimen yang menggunakan hewan uji diserahkan kepada pihak tertentu.
9. Ambil langkah-langkah yang memadai (memakai bola hisap dan kaca mata) terhadap kemungkinan bahan biologis berbahaya ketika menangani darah manusia atau jaringan.
10. Gunakan pelindung wajah dan sarung tangan ketika bekerja dengan sinar ultraviolet.
11. Gunakan sarung tangan ketika bekerja dengan mutagen.
12. Limbah cair harus diproses.

Bahan dan Alat *

Sampel

1. Daun suji (diambil dari kebun MRCPP)
2. *Padina australis* (koleksi dari Pulau Panjang)
3. *Spirulina platensis* (serbuk dari Synergy)

Bahan dan pelarut kimia

1. Nitrogen cair : lab. MRCPP
2. Aseton (PA; Merck) : 200 mL
3. Methanol (PA; Merck) : 100 mL
4. Calcium carbonate (PA; Merck) : 1 g
5. Sodium askorbate (PA; Merck) : 1 g
6. Dietil eter (PA; Merck) : 100 mL
7. Hexana (PA; Merck) : 200 mL
8. Petroleum eter (PA; Merck) : 100 mL
9. Saturasi garam dapur : lab MRCPP
10. Nitrogen gas : lab MRCPP
11. Silica gel 60 F254 (Merck) : 20 g
12. Kapas : secukupnya

Peralatan

1. Mortar dan pestle : 2 buah
2. Timbangan analitik : 1 buah (MRCPP)
3. Sonikator (Elmasonic S15 H) : 1 buah (MRCPP)
4. Pipet mikro (200-1000 μ L) : 1 buah
5. Blue tips : 20 buah
6. Tabung eppendorf (2 mL) : 50 buah
7. Vortex (IKA Genius 3) : 1 buah (MRCPP)
8. Tempat es : 3 buah
9. Timer : 3 buah
10. Sentrifuse (HERMLE; z 160 M) : 1 buah (MRCPP)

* Alat dan bahan untuk eksperimen ekstraksi dan pemisahan pigmen. Alat dan bahan untuk eksperimen lainnya menyesuaikan dengan keterangan setiap

eksperimen.

11. Tabung reaksi + penutup ulir : 15 buah
12. Pipet Pasteur (gelas) : 15 buah
13. Nipple untuk pipet Pasteur : 6 buah
14. Gelas beker (pyrex; 20 mL) : 3 buah
15. Gelas beker (pyrex; 100 mL) : 3 buah
16. Kolf (pyrex; 50 mL) : 3 buah
17. Gelas ukur (pyrex; 10 mL) : 3 buah
18. Rotary evaporator : 1 buah (MRCPP)
19. Magnetic bar (panjang 2 cm) : 3 buah
20. Stirrer : 1 buah (MRCPP)

Eksperimen 1

Ekstraksi dan Separasi Pigmen dari Matriksnya

Capaian pembelajaran:

1. Mahasiswa dapat menguasai dasar-dasar konsep teoritis dan praktis dalam ekstraksi senyawa kimia dari suatu sampel.
2. Mahasiswa dapat menguasai dasar-dasar konsep teoritis dan praktis dalam separasi senyawa kimia dari suatu matrix dengan teknik ekstraksi cair-cair dan kromatografi kolom terbuka untuk separasi masing-masing komponen.

Pengantar

Pigmen khususnya klorofil dan karotenoid sangat sensitive terhadap oksigen, panas, cahaya, asam dan basa serta enzim tertentu yang dapat mengkonversi pigmen ini menjadi turunannya. Oleh sebab itu, untuk meminimalisir reaksi yang merusak atau yang tidak dikehendaki selama proses ekstraksi pigmen, beberapa manipulasi, misalnya: penghilangan oksigen terlarut dalam pelarut, pemberian antioksidan, suhu yang rendah, tanpa cahaya, penetral asam dan basa, harus dilakukan. Suatu metode ekstraksi yang baik harus dapat mengangkat pigmen secara total dengan sedikit atau tanpa perubahan yang terjadi didalamnya. Klorofil dan karotenoid memiliki kelarutan yang baik dalam acetone atau campuran acetone dan metanol. Karena sifat acetone dan metanol yang dapat bercampur dengan air, maka kedua pelarut ini sering digunakan untuk ekstraksi klorofil dan karotenoid dari bahan biologis yang mengandung air.

Pemisahan pigmen dengan senyawa lainnya, misal lipid, dari ekstrak pigmen dapat dilakukan dengan partisi antara 2 jenis pelarut yang saling tidak bercampur. Pada umumnya pelarut non-polar digunakan untuk menarik fraksi pigmen dari larutan akueus. Lebih lanjut pemisahan pigmen dapat dilakukan dengan teknik kromatografi. Berbagai jenis metode kromatografi telah dikembangkan untuk memisahkan pigmen. Diantara teknik pemisahan yang sering digunakan, kromatografi kolom terbuka masih merupakan teknik yang sangat bermanfaat untuk preparasi pigmen skala besar dari pigmen kasar

dan ekstrak yang sudah mengalami pemurnian sebagian. Kromatografi kolom terbuka memiliki keunggulan karena sederhana, cepat dan mudah untuk pemisahan pigmen skala besar tanpa menggunakan fasilitas khusus atau bahan yang sangat mahal.

Prosedur eksperimen:

Kelas akan dibagi menjadi 3 (tiga) kelompok yang masing-masing kelompok akan mengerjakan jenis sampel yang berbeda namun akan melakukan ekstraksi, separasi, karakterisasi dan identifikasi dari analit yang sama yaitu klorofil dan karotenoi. Jenis sampel yang digunakan adalah daun suji, *Padina australis* (*P. australis*; rumput laut cokelat) dan *Spirulina platensis* (*S. platensis*; mikroalga).

A. Ekstraksi

Sampel daun suji dan *P. australis* ditumbuk sampai halus dalam kondisi dingin dengan ditambah nitrogen cair. Serbuk daun suji (0,5 g) atau serbuk *P. australis* (0,5 g) atau *S. platensis* (0,1 g) diekstraksi menggunakan campuran pelarut aseton dan metanol (3:7, v/v; 1 mL dalam tabung eppendorf) dengan ditambah calcium carbonate sebagai agen penetral dan sodium ascorbate sebagai antioksidan. Proses ekstraksi dilakukan tanpa cahaya (atau remang-remang) dengan cara divortek (1 menit) kemudian dilanjutkan disimpan dalam es (1 min). Proses pemvortekan dan penyimpanan dalam es diulang sampai 5 kali. Ekstrak pigmen kasar dipisahkan dari residunya menggunakan sentrifuse dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 min. Residu diekstraksi kembali dengan cara yang sama seperti diatas sampai residu tidak berwarna. Semua ekstrak pigmen kasar digabung untuk proses selanjutnya.

B. Partisi/Separasi Cair-Cair

Ekstrak pigmen kasar dimasukkan kedalam corong pisah atau tabung reaksi kemudian ditambah dengan dietil eter atau hexana atau petroleum eter atau 2 campuran dari pelarut-pelarut tersebut. Proses partisi dilakukan dengan cara mengkocok ekstrak pigmen dan pelarut yang sudah ditambahkan, kemudian untuk membantu pemisahan 2 larutan tersebut,

larutan garam jenuh ditambahkan kedalam corong pisah dilanjutkan dengan proses pengkocokan. Air ledeng perlu ditambahkan untuk memperjelas pemisahan. Lapisan atas yang mengandung pigmen ditampung, jika lapisan bawah masih berwarna maka perlu dipartisi ulang dengan cara yang sama seperti diatas. Ekstrak pigmen dipekatkan dengan ratavapor (jika volume banyak) dan atau dikeringkan dengan gas nitrogen.

C. Separasi dengan Kromatografi Kolom Terbuka

Pigmen-pigmen dari ekstrak pigmen sampel dipisahkan menggunakan kromatografi kolom terbuka dengan fase diam silica gel 60 F254 (Merck) dan fase gerak hexane 100%, aseton:heksana (1:4, v/v), aseton:hexane (1:1, v/v), aseton 100%, dan methanol 100%.

Untuk persiapan kromatografi kolom terbuka, silica gel diaktifkan dalam hexane 100% dengan cara disonikasi atau diaduk untuk beberapa saat, kemudian dimasukkan kedalam pipet pasteur dengan ujung pipet yang sudah diberi kapas tipis. Fase diam diekuilibrasi dengan hexane 100%, kemudian ekstrak pigmen yang sudah dilarutkan dalam heksana 100% dimasukkan diatas fase diam tersebut. Setelah semua ekstrak pigmen masuk kedalam fase diam, masing-masing fase gerak ditambahkan dari pelarut yang non-polar ke pelarut yang lebih polar sehingga terjadi pemisahan pigmen. Pigmen hasil pemurnian ditampung dan dikeringkan dengan gas nitrogen. Pigmen disimpan pada almari pendingin (-30°C).

Eksperimen 2

Pengukuran Kadar Air dengan Moisture Balance

Capaian pembelajaran:

- 1. Mahasiswa dapat mengukur kadar air sampel menggunakan moisture balance**

Pengantar

Kandungan pigmen suatu sampel sangat dipengaruhi oleh kadar air yang terkandung didalamnya. Oleh karena itu sangat penting untuk menghitung kandungan pigmen per gram berat kering.

Prosedur eksperimen

- 1. Menyalakan Moistur Balance**
 - Sambungkan kabel power ke sumber listrik
 - Pada layar akan terlihat tampilan OFF
 - Tekan tombol power
 - Buka kover MOC63U
 - Masukkan sample pan (jangan sampai miring)
 - Tekan tombol Tare dan di layar akan terlihat sample berkedip. Hal ini menandakan bahwa sampel belum ditempatkan di sampel pan
- 2. Pengukuran Kadar Air**
 - Pastikan sebelum memasukkan sampel, dilakukan zero point adjust dengan menekan tombol O/T
 - Tunggu sampai kondisi stabil yang ditunjukkan oleh munculnya anak panah dibawah program.
 - Sampel diletakkan di sampel pan (selang waktu antara zero adjust hingga start jangan lebih dari 3 menit, jika lebih dari 3 menit maka di layar akan tertampil error. Jika terjadi error maka tekan tombol ESC).
 - Setelah sampel diletakkan di dalam sampel pan, tutup kover MOC63U. Diamkan dan MOC63U akan secara otomatis memulai pengukuran. Pengukuran selesai saat angka tertampil di layar sudah tidak berubah lagi
- 3. Mematikan Moistur Balance**
 - Buka kover MOC63U, tekan tombol power

- Setelah alat dimatikan, tutup kembali kover. Bersihkan sampel pan dan rapikan kembali ke tempat penyimpanannya.

Eksperimen 3

Pengenalan Sumber Cahaya

Radiasi Benda Hitam (*Blackbody Radiation*) – Bagaimana perbedaan sumber cahaya?

Capaian pembelajaran:

1. Mahasiswa mengenal karakteristik sumber cahaya
2. Mahasiswa dapat mengukur dan memvalidasi spektrum sumber cahaya

Pengantar

Kita sudah mengetahui bahwa objek panas memancarkan cahaya dengan warna yang berbeda-beda contohnya dari elemen pemanas kompor listrik yang memancarkan warna merah hingga warna putih yang dipancarkan oleh bola lampu. Cahaya yang dipancarkan oleh objek panas yang memancarkan radiasi dapat didispersikan oleh prisma untuk menghasilkan spektrum warna kontinu. Intensitas cahaya berangsur-angsur berubah berdasarkan panjang gelombang, memuncak pada panjang gelombang yang ditentukan berdasarkan suhu sumber.

Hubungan antara panjang gelombang, frekuensi, dan energi dari cahaya dapat diekspresikan dalam persamaan berikut:

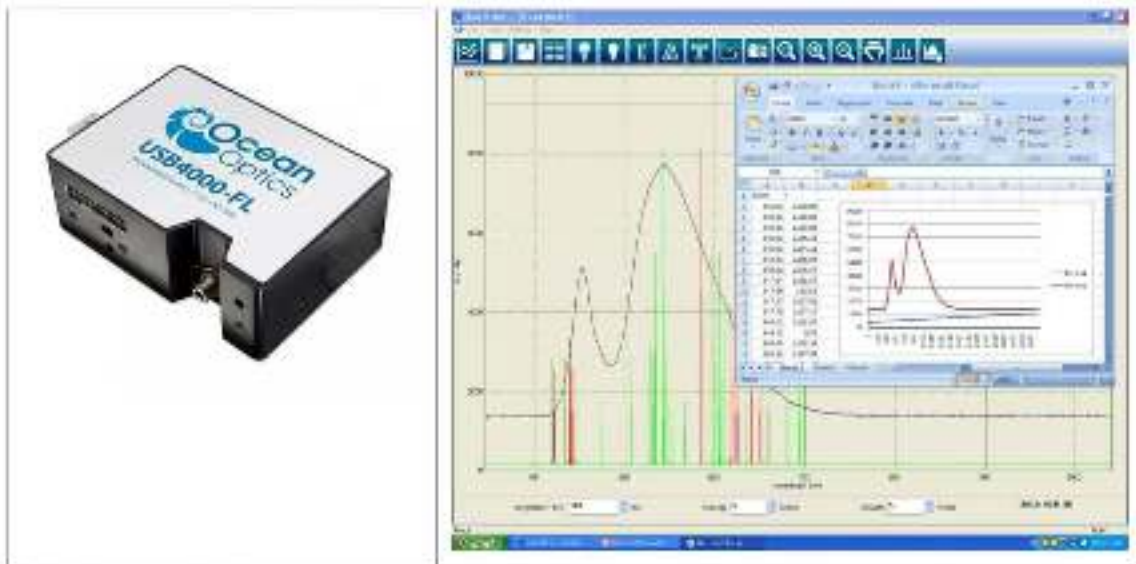
$$\lambda = c / \nu \dots\dots\dots(1), \text{ dan}$$

$$E = h \nu \dots\dots\dots(2)$$

Sedangkan jumlah radiasi yang dipancarkan dari suatu objek panas tergantung dari 2 hal yaitu, seberapa panas dan panjang gelombang yang dihasilkan. Hubungan tersebut dapat diekspresikan dalam persamaan perhitungan intensitas atau densitas spektrum (I) berikut:

$$I = \frac{2\pi^5 k^4}{15 h^3 c^2} T^3 \dots\dots\dots(3)$$

dimana h adalah konstanta Plank (6.62607×10^{-34} Js), c adalah kecepatan cahaya, dan k adalah konstanta Boltzmann (1.38×10^{-23} JK⁻¹), T adalah temperatur dalam Kelvin dan λ adalah panjang gelombang dalam nanometer.



Gambar 1. Spektrometer ocean optic USB4000FL (kiri) dan tampilan software *overture* yang mendeteksi spektrum dari lampu neon rumahan, serta data yang dibuka melalui Excel.

Prosedur eksperimen

1. Gunakan Ocean Optic Spectrometer USB4000FL untuk pengukuran dengan software Overture (unduh software gratis di link; <http://halmapr.com/news/oceanoptics/2011/08/22/ocean-optics-overture-free-spectrometer-operating-software/>).
2. Perhatikan spesifikasi dari USB4000FL (lihat di link; <http://oceanoptics.com/product/usb4000-fl/>) dengan memperhatikan (a) rentang panjang gelombang, (b) waktu integrasi, (c) rasio signal-to-noise, (d) lebar slit, dan (e) resolusi optik.
3. Lakukan pengukuran spektrum tampak dari sumber cahaya berikut (a) halogen lamp, (b) lampu neon rumah, (c) LED merah, dan (d) sinar matahari.
4. Simpan poin data dari spektrum yang telah diukur dan buka dalam Excel.

5. Buatlah plot fungsi radiasi benda hitam (I vs. λ). Buatlah plot grafik fungsi densitas spektrum tersebut untuk temperature 4000, 5000, dan 6000 K pada grafik spektrum yang sama. **Perbedaan apakah yang dapat dilihat saat temperature naik?**
6. Gunakan fungsi *curve fitting* pada Excel, untuk melakukan *fit* data spektrum sumber cahaya lampu halogen (atau lampu neon) dan cahaya matahari.
7. Pada temperatur berapakah yang dapat memberikan hasil *fit* terbaik?
8. Antara lampu halogen (atau lampu neon) dan cahaya matahari, sumber manakah yang dapat memberikah radiasi pada cahaya tampak? Bagaimanakah overlap antara spektrum lampu dan spektrum matahari?

Eksperimen 4

Pengenalan aturan dalam spektroskopi: Signal-to-Noise (S/N), Resolusi, Rata-rata Signal, Smoothing

Capaian pembelajaran:

1. Mahasiswa mengenal aturan dasar pengambilan data spektroskopi
2. Mahasiswa dapat menggunakan pengukuran spektroskopi dalam pengambilan data dengan memperhatikan signal-to-noise, resolusi, rata-rata signal dan smoothing

Pengenalan Singkat

Terdapat 4 aturan yang harus diperhatikan dalam melakukan pengukuran dengan metode spektroskopi sehingga data yang dihasilkan dapat dianggap valid dan bermanfaat.

- (1) RESOLUSI. Resolusi dapat didefinisikan secara langsung sebagai kemampuan instrumen untuk bisa membedakan dua signal yang berdekatan. Misalnya bila perhitungan dalam skala panjang gelombang (nanometer, nm) atau dalam frekuensi (*wavenumber*, cm^{-1}) dalam spektroskopi absorpsi, dan bila semua faktor disamakan, maka semakin tinggi resolusinya semakin baik kemampuan untuk mendeteksi dua pita absorpsi yang sangat berdempetan.
- (2) SIGNAL-TO-NOISE. Biasanya disimbolkan dengan S/N artinya perbandingan kekuatan signal yang didapat dari analit dan kekuatan derau (*noise level*), yaitu fluktuasi signal latar belakang instrument (*instrument background signal*). Misalnya dalam spektroskopi absorpsi, bila semakin tinggi S/N maka semakin baik kemampuan untuk mendeteksi pita absorpsi yang lemah, dengan kata lain instrumen mampu mendeteksi absorpsi walau pada tingkat konsentrasi analit yang rendah sekalipun.

- (3) SMOOTHING. Juga dikenal dengan istilah *digital filtering* yaitu melakukan *smoothing* untuk memperbaiki rasio S/N pada spektrum dengan manipulasi digital. Misalnya dengan perhitungan melalui software tertentu (excel, origin atau matlab).
- (4) SIGNAL AVERAGING. Juga dikenal dengan istilah *ensemble averaging*, salah satu cara untuk memperbaiki rasio S/N pada spektrum dengan menambah jumlah beberapa pengukuran data spektrum dan kemudian melakukan perhitungan sehingga menghasilkan data terakhir berupa spektrum rata-rata.

Prosedur Eksperimen:

Prosedur eksperimen menyesuaikan dengan jenis instrumentasi yang akan digunakan, dan langsung diarahkan oleh asisten praktikum.

Eksperimen 5

Spektroskopi Absorpsi untuk Menguji Karakteristik Pigmen dan Menentukan Konsentrasinya dalam sampel

Capaian pembelajaran:

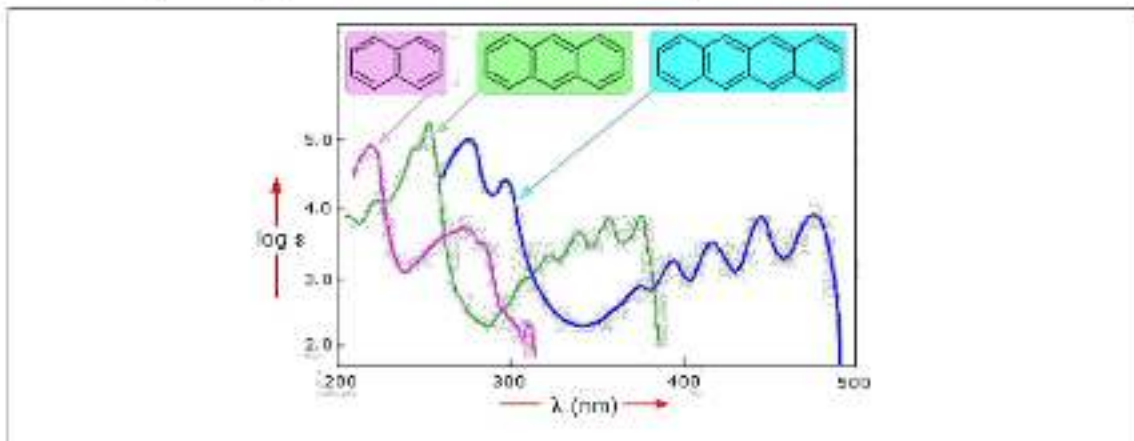
1. Mahasiswa dapat menggunakan spektroskopi absorpsi UV-VIS/NIR untuk menguji karakteristik kualitatif dari suatu senyawa kimia terkonjugasi.
2. Mahasiswa dapat menggunakan hukum Beer-Lambert untuk mengetahui secara kuantitatif kandungan senyawa kimia dalam sampel.

Pendahuluan

Radiasi elektromagnet pada daerah panjang gelombang ultraviolet hingga cahaya tampak memiliki energi yang cukup untuk berinteraksi dengan molekul. Apabila molekul tersebut menyerap energi tersebut maka akan menyebabkan tereksitasinya elektron yang berikatan ke tingkat orbital-orbital energi yang lebih tinggi. Pada molekul organik, teknik ini digunakan untuk diagnostik karakteristik dari ikatan-ikatan rangkap terkonjugasi, dimana delokalisasi elektron π pada sistem terkonjugasi menurunkan jarak energi antara orbital molekul terisi yang tertinggi (HOMO) dan orbital molekul tidak terisi yang terendah (LUMO). Sistem ikatan rangkap terkonjugasi tersebut dinamakan **kromofor**, dimana panjang kromofor akan menentukan panjang gelombang yang boleh lewat atau yang harus diserap dan dipantulkan oleh suatu molekul saat berinteraksi dengan radiasi elektromagnet pada daerah UV-Vis.

Gambar 2 menunjukkan spektra absorpsi dari molekul naphthalene, anthracene, dan tetracene. Dengan meningkatnya konjugasi pada struktur molekul tersebut menyebabkan bergesernya serapan maksimum (λ_{max}) ke panjang gelombang yang lebih panjang. Berdasarkan spektrum tersebut juga

kita bisa menarik kesimpulan bahwa naphthalene dan anthracene tidak berwarna, sedangkan tetracene berwarna oranye.



Gambar 2. Spektrum absorpsi uv-vis naphthalene, anthracene, dan tetracene

Penggunaan pelarut organik juga akan mempengaruhi spektrum serapan dari senyawa kimia. Selain menentukan limit panjang gelombang untuk analisis (perhatikan Gambar 3), maka pelarut organik dapat menggeser posisi λ_{max} . Prinsip Frank-Condon menyatakan bahwa saat eksitasi elektronik, atom tidak bergerak, namun elektron – termasuk miliknya pelarut organik – akan menyesuaikan sendiri masing-masing. Hampir semua transisi mengakibatkan keadaan tereksitasi menjadi lebih polar dibandingkan dengan keadaan dasar. Jika pelarut organik bersifat polar digunakan, maka keadaan tereksitasi dapat lebih mudah distabilkan melalui interaksi dipol-dipol dibandingkan dengan keadaan dasar. Terdapat dua macam jenis pergeseran λ_{max} yaitu **bathochromic** dan **hypsochromic**. Pergeseran yang disebut dengan bathochromic adalah pergeseran ke arah panjang gelombang yang panjang atau bergeser ke warna gelombang merah. Sedangkan yang disebut dengan hypsochromic adalah pergeseran ke arah panjang gelombang yang pendek.

Spektroskopi serapan UV-Vis memberikan kita dua informasi penting. Yang pertama adalah posisi dari serapan maksimum dalam nanometer (nm), seperti yang diuraikan diatas. Informasi tersebut menunjukkan energi (ϵE) dimana eksitasi elektronik terjadi, serta kondisi kromofor yang menyebabkan serapan tersebut.

Informasi yang kedua yaitu absorbtivitas molar atau serapan spesifik atau ekstingsi (ϵ). Nilai koefisien ini adalah tetap/konstan untuk suatu molekul pada panjang gelombang tertentu. Nilai ini menunjukkan seberapa mudah suatu transisi elektronik dapat disebabkan oleh serapan dari radiasi pada panjang gelombang tersebut. Jika suatu transisi elektronik memerlukan energi dari radiasi dapat mudah berlangsung maka cahaya akan diserap dengan kuat dan nilai ϵ besar. Jika transisi tidak berlangsung dengan mudah maka nilai ϵ akan kecil. Transisi elektronik tersebut sering dibedakan menjadi transisi yang diperbolehkan (**allowed**) dan yang terlarang (**forbidden**), yang dapat dibedakan berdasarkan korelasi simetri antara keadaan dasar dan keadaan tereksitasi.

Apabila mau membandingkan nilai ϵ antara senyawa yang berbeda maka perbandingan tersebut hanya valid jika dianalisa pada larutan yang telah disamakan molaritasnya. Dengan meningkatkan konsentrasi senyawa terlarut dalam larutan maka otomatis kemampuan larutan tersebut dalam menyerap radiasi akan semakin tinggi. Hubungan antara absorbtivitas molar ($L \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$) dan konsentrasi dari molekul ($mol L^{-1}$) dapat diekspresikan dengan hukum **Beer-Lambert**:

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon c l \dots\dots\dots(4)$$

$$\epsilon = \epsilon' / c \dots\dots\dots(5)$$

Dimana:

I_0 adalah intensitas dari cahaya insiden, dan I adalah intensitas cahaya yang ditransmisikan, dimana logaritmus dari perbandingan keduanya menghasilkan A yaitu absorbansi. Sedangkan c adalah konsentrasi dan l adalah lebar kuvet (cm). Serapan spesifik ϵ' atau ekstingsi ϵ' artinya serapan dari 1% (w/v) larutan dengan panjang jalan cahaya 1 cm.

Prosedur Eksperimen

1. Bacalah prosedur eksperimen dengan baik dan tentukanlah alat dan bahan yang anda perlukan. Buatlah tabel yang mendata alat
2. Buatlah larutan beta-karoten (pigmen murni) atau ekstrak pigmen sebanyak 5 mL (menyesuaikan) dalam pelarut aseton dengan

konsentrasi yang tepat sehingga menghasilkan serapan maksimum antara 0.5-06.

3. Buatlah juga larutan yang sama dengan nomor 1 namun menggunakan pelarut yang berbeda yaitu heksan, toluen, petroleum eter, kloroform, dietil eter dan etanol.
4. Ukurlah spektrum masing-masing sampel (6 sampel) pada panjang gelombang 300 s.d. 700 nm. Tentukan dan catat skala resolusi pengukuran.
5. Visualisasikanlah spektra beta-karoten dalam 6 jenis pelarut tersebut dalam satu gambar spektrum dan buatlah tabel yang sistematis dengan informasi lengkap tentang karakteristik pelarut serta perubahan yang terjadi pada spektrum absorpsi. Bahaslah interpretasi dari gambar spektrum dan tabel dengan menulis deskripsi bahasan pada buku log.
6. Buatlah pengenceran dari sampel yang ada sebanyak 5 pengenceran dengan konsentrasi yang berbeda kemudian buatlah kurva kalibrasi standar untuk menghitung konsentrasi secara kuantitatif. Perhatikan statistika dan tentukan jumlah pengulangan untuk menghasilkan kurva yang baik. Tulislah bahasan interpretasi pada buku log kalian.
7. Perhatikan kaidah S/N, resolusi, rata-rata signal dan smoothing saat anda melakukan pengenceran pada konsentrasi yang rendah.
8. Bandingkan hasil anda dengan karotenoid jenis lain, cobalah cari karotenoid dengan panjang ikatan terkonjugasi yang berbeda.
9. Carilah minimal 2 literatur jurnal yang membahas tentang karakterisasi dan identifikasi karotenoid dalam berbagai pelarut. Lakukan pembahasan dengan mengaitkan antara hasil eksperimen yang anda dapatkan dan menurut literatur tersebut.
10. Buatlah laporan sesuai dengan format yang ditentukan. Diskusikan dengan pembimbing praktikum untuk menghasilkan laporan yang baik.
11. Perhitungan kandungan klorofil *a*, klorofil *b*, total klorofil dan total karotenoid ($\mu\text{g/mL}$) dari ekstrak pigmen dalam pelarut aseton berdasarkan persamaan Lichtenthaler[†] sebagai berikut:

$$[\text{Klorofil } a] = (11,24 \times A_{681,6}) - (2,04 \times A_{644,8})$$

[†] Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148, 350-382.

$$\begin{aligned}
 \text{[Klorofil b]} &= (20,13 \times A_{644,8}) - (4,19 \times A_{661,8}) \\
 \text{[Total klorofil]} &= (7,05 \times A_{661,6}) + (18,09 \times A_{644,8}) \\
 \text{[Total karotenoid]} &= ((1000 \times A_{470}) - (1,90 \times [\text{klorofil a}] - \\
 & (63,14 \times [\text{klorofil b}])) / 214
 \end{aligned}$$

Eksperimen 6

Mengkonstruksi spektrometer/photometer dari awal hingga akuisisi data

Capaian pembelajaran:

1. Mahasiswa mengetahui konstruksi spektrometer/photometer sederhana
2. Mahasiswa dapat mengukur dan memvalidasi spektrometer/photometer sederhana

Pengantar

Instrumen spektrofotometri merupakan instrumen yang titik beratnya pada pengukuran besaran cahaya dan sifat aneka ragam material dan obyek, bagaimana berinteraksi terhadap radisi cahaya dan daerah cahaya tampak. Kuantitas dasar yang termasuk dalam spektrofotometri adalah penyerapan (absorpsi cahaya), pantulan (refleksi cahaya), pembauran (emisi cahaya) dan penerusan (transmisi cahaya). Kuantitas tersebut memberikan gambaran terhadap sifat-sifat zat yang diukur.



Gambar 1. Skema Konfigurasi Spektrometer

Keterangan:

RS = Sumber Radiasi

M/F = Monokromator / Filter

SC = Sample Compartment

D = Detector

A = Amplifier

A/D = Analog to Digital Converter

a) Sumber Radiasi

Sumber radiasi berguna untuk memberikan radiasi dengan λ tertentu. Untuk daerah UV, umumnya digunakan lampu hydrogen atau lampu Deuterium,

sedangkan untuk daerah sinar tampak umumnya digunakan lampu tungsten, lampu pijar, maupun lampu halogen. Pada penelitian ini digunakan sumber radiasi monokromatik berupa LED sehingga tidak diperlukan monokromator ataupun filter.

b) Monokromator

Monokromator berfungsi untuk mengubah radiasi polikromatis yang dipancarkan oleh sumber radiasi menjadi radiasi monokromatis.

Monokromator ini umumnya terdiri dari celah masuk (entrance slit), filter optik, prisma dan atau kisi (gratting) dan celah keluar (exit slit). Celah masuk berfungsi untuk masuknya cahaya yang berasal dari sumber radiasi, filter optik berfungsi untuk menyerap warna komplementer agar sinar tampak yang diteruskan merupakan sinar yang warnanya sesuai dengan warna filter optik yang dipakai. Pada praktikum ini tidak menggunakan filter ataupun monokromator disebabkan oleh penggunaan sumber radiasi cahaya monokromatik berupa LED.

c) Tempat Cuplikan

Tempat cuplikan berfungsi untuk meletakkan wadah cuplikan (sel / kuvet) dari silika / kuarsa. Jadi cuplikan dimasukkan ke dalam sel / kuvet dan diletakkan pada sampel compartment untuk diukur kadarnya. Pada penelitian ini menggunakan kuvet persegi dari plastik.

d) Detektor

Sensor cahaya adalah alat yang digunakan untuk merubah besaran cahaya menjadi besaran listrik. Salah satu jenis sensor cahaya adalah diode foto. Dioda foto adalah jenis dioda yang berfungsi mendeteksi cahaya. Berbeda dengan diode biasa, komponen elektronika ini akan mengubah cahaya menjadi arus listrik. Cahaya yang dapat dideteksi oleh diode foto ini mulai dari cahaya infra merah, cahaya tampak, ultra ungu sampai dengan sinar-X. Aplikasi diode foto mulai dari penghitung kendaraan di jalan umum secara otomatis, pengukur cahaya pada kamera serta beberapa peralatan di bidang medis. Dalam praktikum ini menggunakan sensor TSL250R yang merupakan komponen diode foto dan penguat operasi yang terintegrasi ke dalam satu komponen.

e) Penguat Operasi

Penguat operasi berfungsi untuk menguatkan sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor. Penguat yang digunakan adalah penguat operasi (operational amplifier). Karakteristik dari suatu operational amplifier adalah sebagai berikut :

- impedansi masukan yang sangat tinggi sehingga arus masukan dapat diabaikan
- penguatan loop terbuka (A_v) sangat tinggi; dimana keluaran dari penguat menjadi
$$V_{out} = A_v [(V_+) - (V_-)]$$
- impedansi keluaran amat rendah sehingga keluaran penguat tidak berpengaruh pada pembebanan
- Penguatnya terkopel langsung (direct coupled)
- Penguatan (A) = ∞ (tak terhingga)
- Tegangan keluaran ada 0 (nol), kalau tegangan masukan 0 (nol)
- Tegangan keluaran dapat mengayun ke arah positif maupun ke arah negatif
- Lebar jalurnya (band width) tak terhingga lebarnya

f) ADC

Untuk mengubah atau mengolah suatu variabel fisik yang umumnya bersifat analog dengan piranti digital, variabel tersebut harus diubah terlebih dahulu menjadi variabel digital yang nilainya proporsional dengan nilai variabel yang akan diukur atau diolah. Resolusi ADC mengacu pada jumlah bit dalam keluaran biner ADC.

2.8 MIKROKONTROLLER

Mikrokontroller berfungsi untuk mengontrol kerja suatu sistem. Di dalam mikrokontroller terdapat CPU, ALU, PC, SP, dan register lain yang terdapat pada mikroprosesor, tetapi dengan penambahan perangkat-perangkat lain seperti ROM, RAM, PIO, SIO, Counter, dan rangkaian Clock. Mikrokontroller didesain dengan instruksi-instruksi yang lebih luas dan 8 bit instruksi digunakan untuk membaca data instruksi dari internal memory ke ALU.

Banyak instruksi yang digabung dengan pin-pin pada chip-nya. Pin tersebut adalah pin yang dapat diprogram yang mempunyai fungsi berbeda. Praktikum ini menggunakan Arduino Uno sebagai ADC dan Mikrokontroler terintegrasi.



Gambar 2. Arduino Uno

Alat dan bahan

Pada praktikum ini digunakan alat dan bahan sebagai berikut:

- 1) Lampu LED merah
- 2) Sensor diode foto dan penguat operasi terintegrasi TSL-250
- 3) Papan mikrokontroler dan ADC terintegrasi Arduino uno
- 4) Breadboard dan kabel jumper beserta resistor 100 kOhm
- 5) Kuvet plastik
- 6) Sampel (klorofil cair) pada 5 konsentrasi pengenceran berbeda

Prosedur eksperimen

1. Siapkan sampel klorofil cair dengan melarutkan 0.5 gram spirulina dalam etanol cair sebanyak 10 ml kemudian saring menggunakan

kertas saring. Buatlah 5 larutan klorofil dengan pengenceran 1x, 2x, 3x, 4x dan 5x. Sisihkan terlebih dahulu jika sudah selesai.

2. Rangkai spektrofotometer dengan bahan yang sudah ada sesuai dengan skema yang terdapat pada gambar 1 dan mengikuti instruksi asisten praktikum.
3. Jika konstruksi spektrofotometer sederhana telah selesai lakukan pengukuran sampel klorofil cair pada 5 konsentrasi pengenceran dengan menggunakan serial interface pada Arduino IDE untuk melihat hasil pengukuran.
4. Simpan poin data dari spektrum yang telah diukur dan buka dalam Excel.
5. Buatlah plot konsentrasi versus intensitas (*I* vs. Konsentrasi)..
Perbedaan apakah yang dapat dilihat saat konsentrasi naik?
6. Gunakan fungsi *curve fitting* pada Excel, untuk melakukan *fit* data kurva konsentrasi versus intensitas.

Eksperimen 7

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) 1: Sistem kerja

Capaian pembelajaran:

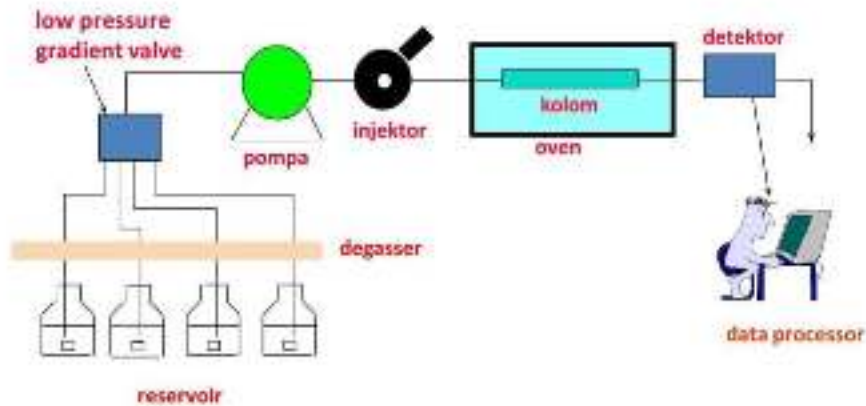
1. Mahasiswa memahami kromatografi cair beserta system dan metode yang digunakan
2. Mahasiswa mengenal dan mengerti fungsi serta tipe untuk setiap bagian pada KCKT
3. Mahasiswa dapat mengoperasikan KCKT

Pengantar

Kromatografi cair merupakan suatu teknik pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya. Interaksi antara fase diam, fase gerak dan sampel sangat mempengaruhi pemisahan suatu senyawa. Fase normal dan fase terbalik merupakan 2 sistem elusi yang digunakan pada kromatografi cair. Fase normal menggunakan fase diam yang bersifat polar (misal: silica, calcium carbonate dll.) dan fase gerak yang non polar (misal: heksana, toluene, dll.), sehingga senyawa yang lebih non polar akan terelusi terlebih dahulu dibandingkan dengan senyawa yang lebih polar. Sedangkan fase diam yang bersifat non polar (misal: C8, C18, C30 dll.) dan fase gerak yang bersifat polar (misal: air, asetonitril, methanol, dll.) merupakan kombinasi yang digunakan pada kromatografi cair fase terbalik.

Terdapat beberapa jenis kromatografi cair dari yang sederhana sampai yang lebih maju, yaitu kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Metode isokratik and metode gradien (*low pressure* dan *high pressure*) merupakan metode elusi kromatografi cair yang sering digunakan pada KCKT. Metode isokratik pada umumnya menggunakan jenis dan rasio pelarut yang sama, sedangkan metode gradient jenis dan rasio pelarut bisa diatur selama proses analisa KCKT. Berikut adalah skema dari metode elusi gradient *low-pressure* (Gambar 1) beserta daftar bagian dari KCKT beserta fungsi dan tipenya masing-masing (tabel1).

SISTEM GRADIEN LOW-PRESSURE



Gambar 1. Skema metode elusi gradient low-pressure.

Tabel 1. Bagian KCKT beserta fungsi dan tipe dari masing-masing bagian.

No	Bagian KCKT	Fungsi	Tipe
1	Pengontrol sistem	Untuk menghubungkan antara bagian KCKT dan komputer	CBM-20Alite; CBM-20A
2	Tempat pelarut	Untuk menampung pelarut tunggal atau pelarut campuran	
3	Degasser	Untuk menghilangkan gelembung udara pada pelarut	DGU-20A3 (isokratik dan high pressure), DGU20A5 (low pressure)
4	Pencampur pelarut; low pressure gradient valve	Untuk mencampur pelarut sesuai dengan metode KCKT yang digunakan	
5	Unit pengantar pelarut (pompa)	Untuk mengalirkan pelarut keseluruhan bagian KCKT	LC-20AD (Isokratik), LC-20AB (high pressure), LC-20AT (low pressure)
6	Auto-sampler	Tempat sampel yang dilengkapi dengan pendingin dan untuk menginjek sampel secara otomatis	SIL-20AC
	Manual injector	Tempat untuk menginjek	Rheodyne 7725

		sampel menggunakan micro syringe	
7	Oven kolom	Untuk menjaga suhu kolom dan mendukung analisa yang stabil	CTO-20AC
8	kolom	Kolom fase normal atau kolom fase terbalik	C8, C18, C30 (fase terbalik), silica (fase normal)
9	Detektor	Untuk mendeteksi senyawa yang sudah terpisahkan	SPD-20AV (UV-Vis Detector), SPD-M20A (PDA detector), MS
10	Computer + LC solution	Untuk pengoperasian KCKT	-
11	Pengkoleksi fraksi (tambahan)	Untuk mengoleksi fraksi yang sudah dipisahkan	FRC-10A
12	Keran penyeleksi arah alir (tambahan)	Untuk mengatur arah alir pelarut ke tempat pembuangan atau ke detector MS	FCV-20AH

Prosedur eksperimen

1. Persiapan sampel. (a) Ekstrak pigmen kering dari *Padina australis* disimpan dalam almari pendingin (-80°C). (b) Ketika sistim KCKT sudah siap, ekstrak pigmen kering dilarutkan kedalam 1 mL aseton dan difiltrasi menggunakan membrane filter (Nilon, 20 µm).
2. Penyiapan pelarut. Pelarut yang digunakan untuk analisa KCKT, yaitu aseton (PA), metanol (PA) dan larutan amonium asetat (1 M). difiltrasi menggunakan pompa vakum dengan membrane filter (nilon untuk pelarut organik, sedangkan selulosa untuk larutan akueous), kemudian pelarut disonikasi untuk menghilangkan gas terlarut. Proses sonikasi pelarut dilakukan untuk meringankan kerja degasser.
3. Pengaktifan KCKT dan komputer. Beberapa bagian KCKT (pengontrol sistem, unit pengantar pelarut, detektor, oven kolom)serta komputer dihidupkan, setelah semua bagian KCKT telah siap maka software LC

solution diaktifkan dan dipilih LC. Terdengar bunyi dari KCKT yang menandakan bahwa instrument pada KCKT sudah terhubung dengan komputer.

4. Pembuatan metode KCKT. Pengaturan beberapa parameter yang terdapat pada metode KCKT antara lain (1) program elusi (gradient atau isokratik), (2) lama analisa (pompa, detector), (3) suhu kolom, (4) laju alir, (5) suhu sel, (6) panjang gelombang deteksi, dll serta pengecekan sample loop, kolom, dll yang akan digunakan. Jika metode KCKT sudah ada, maka tahap pengaturan beberapa parameter dilewati dan diganti dengan memanggil metode yang akan digunakan. Untuk mengaktifkan metode KCKT atau perubahan parameter pada metode KCKT maka perlu dipilih download untuk mengirimkan perintah ke komputer.
5. Ekuilibrasi kolom. Pelarut KCKT dimasukkan ke dalam tempat pelarut sesuai dengan metode KCKT yang akan digunakan. Tahapan purging terhadap masing-masing pelarut perlu dilakukan untuk meyakinkan bahwa memang sudah tidak terdapat gelembung udara pada saluran pelarut dari tempat pelarut sampai di keran sebelum menuju kolom KCKT (dengan membuka posisi keran agar aliran pelarut menuju ke pembuangan). Setelah tahapan purging pelarut, kolom dialiri dengan pelarut KCKT selama kurang lebih 20 min agar ekuilibrasi kolom tercapai dengan sempurna (ditandai dengan tekanan pompa konstan, tes baseline sudah baik).
6. Injeksi sampel. Sampel bisa diinjeksikan secara otomatis menggunakan auto-sampler atau secara manual ke injector. Jika secara manual, sebelum proses injeksi sampel, single start dipilih kemudian dilanjutkan dengan mengisi nama sampel dan memilih tempat untuk menyimpan file sampel tersebut, memanggil file background (jika sudah punya), dan mengisi volume sampel yang akan diinjeksikan. Micro syringe yang berisi sampel dimasukkan ke injektor dengan posisi awal injektor pada posisi inject, kemudian posisi injektor diubah ke posisi load untuk menginjeksikan sampel ke sample load. Setelah sample berada di sampel load, maka posisi injektor diubah ke

posisi inject agar pelarut KCKT mendorong sampel yang terdapat pada sample loop menuju ke kolom.

7. Analisa data

Eksperimen 8

Spektrometri Massa

Capaian pembelajaran:

1. Mahasiswa dapat mengoperasikan spektroskopi massa untuk mencari ion prekursor m/z dari sampel pigmen dengan metode *scanning* Q1.
2. Mahasiswa dapat mengoperasikan spektroskopi massa untuk menemukan ion produk m/z dan nilai energi tumbukan dengan mengoptimasi metode MRM untuk mentarget secara spesifik satu jenis pigmen dalam campuran.

Pengantar

Spektroskopi massa berfungsi untuk memisahkan molekul yang bermuatan dengan perbandingan antara massa dengan muatan (m/z) sehingga dari situ massa akurat (m) dari suatu molekul dapat diukur. Dalam spektroskopi massa, molekul analit diionisasi terlebih dahulu misalnya dengan menggunakan metode ionisasi elektrospai (ESI) sehingga menghasilkan molekul analit yang bermuatan. Molekul ion tersebut kemudian dibawa ke kuadropol yang dapat menseleksi ion yang ingin dianalisa dengan menggunakan modus *scanning* sehingga molekul ion prekursor dapat diukur. Dalam kuadropol, molekul ion juga dapat di fragmentasi menjadi ion-ion yang lebih kecil disebut dengan ion produk. Fragmentasi tersebut dapat dengan teknik *collision induced dissociation* (CID) yaitu menumbukkan molekul gas argon dengan ion yang akan dianalisa. Melalui proses fragmentasi tersebut, maka struktur molekul dapat diperkirakan. Disamping metode tersebut, terdapat pula metode *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) yang mampu menganalisa secara kuantitatif proses reaksi fragmentasi dari suatu ion prekursor menjadi suatu ion produk.

Prosedur eksperimen:

1. Buatlah tabel kerja dengan kolom-kolom yang mendaftarkan nama senyawa analit, rumus kimia, struktur kimia, massa akurat dan ion prekursor (m/z). Hitunglah massa akurat dengan menggunakan

perhitungan secara online di

<http://www.sisweb.com/referenc/tools/exactmass.htm>

2. Siapkan juga tabel kerja dengan kolom-kolom yang mendaftar nama senyawa analit, rumus molekul, struktur, ion prekursor, ion produk, Q1 pre bias (V), nilai energi tumbukan (C.E. dalam V), dan Q3 pre bias (V).
3. Siapkanlah analit yang telah dilarutkan dalam pelarut misalnya methanol (MS Grade) dan masukkan dalam vial autosampler.
4. Catat dengan lengkap cara kerja spektroskopi yang terdapat pada petunjuk pemakaian yang tertempel pada spektrometri massa.
5. Pastikan parameter elusi KCKT yaitu
Fase gerak A: 0.1% asam format dalam air
Fase gerak B: 0.1% asam format dalam MeOH
Flow rate : 0.2 mL/min
Column : menyesuaikan LC
Gradient : menyesuaikan
Volum injeksi :menyesuaikan
Temperatur oven : 30°C
6. Pastikan juga parameter MS antara lain:
MS interface :ESI
Heat Block Temperature : 400°C
DL Temperature : 250°C
Nebulizing gas flow : 3 L/min
Drying gas flow : 15 L/min
7. Pastikan kondisi untuk detektor PDA dalam keadaan on dan sesuaikan kondisi rentang pengukuran dan resolusi yang akan digunakan.
8. Pastikan juga kondisi pengukuran MS yaitu mode pengukuran, waktu akuisisi, rentang deteksi m/z , dan juga *event time*.
9. Dalam jendela data pastikan anda dapat memonitor kromatogram KCKT, kromatogram MS, dan juga spektra UV-Vis dan spektra MS.
10. Catat semua kondisi dalam log book anda, dan catat hasil pengukuran dalam kedua tabel yang telah disiapkan. Simpan data spektra dan bahas tentang ion prekursor dan ion produk yang terdeteksi.

DAFTAR LINK MSDS YANG HARUS ANDA MILIKI

1. Aceton
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927062>
2. Etanol
<http://www.nafaa.org/ethanol.pdf>
3. Metanol_
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927227>
4. Dietil eter_
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=ID&language=en&productNumber=346136&brand=SIAL&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsial%2F346136%3Flang%3Den>
5. Heksan_
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927187>
6. Petroleum eter_
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927688>
7. Toluena
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927301>
8. Kloroform_
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927133>